

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-165679

(43)公開日 平成 6年(1994) 6月14日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/12 1/21 5/10	Z N A	7236-4B 8931-4B 9281-4B	C 1 2 N 15/ 00 5/ 00	A B
審査請求 未請求 請求項の数10(全 14 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平4-322918

(22)出願日 平成 4年(1992)12月 2日

特許法第30条第 1 項適用申請有り 平成 4年11月20日、
 日本分子生物学会発行の「第15回 日本分子生物学会年
 会プログラム・講演要旨集」に発表

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目 1 番 1 号

(72)発明者 音田 治夫

茨城県土浦市下高津 4 丁目 5 番 28号

(72)発明者 木村 千春

茨城県つくば市花畑 3 丁目 9 番 7 号 関マ
 ンション204号

(72)発明者 大久保 尚一

茨城県つくば市竹園 2 丁目14番地の13 エ
 ザンス竹園203号

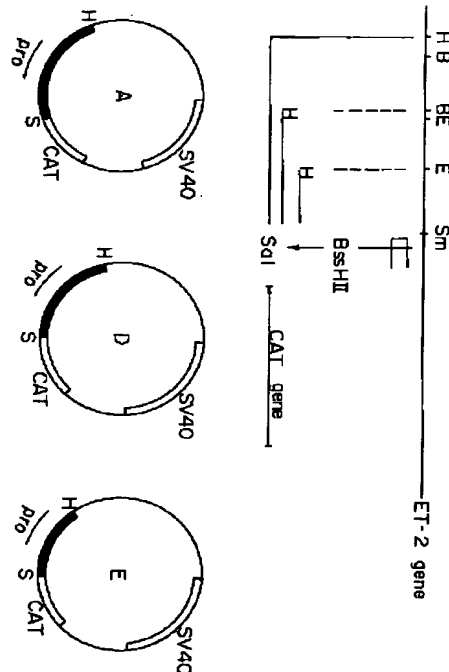
(74)代理人 弁理士 岩田 弘 (外 5 名)

(54)【発明の名称】 ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーター活性を有する領域を含有するDNA

(57)【要約】

【構成】ヒト・エンドセリン-2遺伝子の5' 上流域からプロモーター活性を有する約 3 K b の領域をクローニングした。該領域から制限酵素による切断、B a l 3 1 処理等によって、更に短いDNA断片群を単離し、その転写活性を調べたところ、転写開始点から上流 4 5 塩基までの領域を含有するDNA断片がプロモーターとして機能することを見いだした。

【効果】上記ヒト・エンドセリン-2のプロモーターは、SV 4 0 由来のプロモーターなど公知のものと比較して強力であり、動物細胞用のプロモーターとして極めて有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト・エンドセリン-2 遺伝子のプロモーター活性を有する領域を含有するDNA。

【請求項2】 配列番号2の塩基配列を有するDNAを含有する請求項1記載のDNA。

【請求項3】 配列番号3の塩基配列を有するDNAを含有する請求項1記載のDNA。

【請求項4】 ヒトゲノムDNA由来の請求項1記載のDNA。

【請求項5】 ヒトゲノムDNAが配列番号1の塩基配列を有するDNAである請求項4記載のDNA。

【請求項6】 請求項1記載のDNAを含有するベクター。

【請求項7】 請求項6記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項8】 細菌である請求項7記載の形質転換体。

【請求項9】 動物細胞である請求項7記載の形質転換体。

【請求項10】 請求項7記載の形質転換体を培養し、プロモーター活性を有するDNAの下流に接続した蛋白質またはペプチドをコードする構造遺伝子を発現させることを特徴とする該蛋白質またはペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒト血管収縮ペプチドであるヒト・エンドセリン-2 遺伝子のプロモーター活性を有する領域をコードするDNAを含有するDNA、該DNAを含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換体、及び該形質転換体を培養しプロモーター活性を有するDNAの下流に接続した蛋白質またはペプチドをコードする構造遺伝子を発現させることを特徴とする蛋白質またはペプチドの製造方法に関する。本明細書においてプロモーターとは、RNAポリメラーゼが結合し、RNAの転写の開始のシグナルとなるDNAの領域を指す。

【0002】

【従来の技術】 内皮依存性の血管拡張反応と並んで、種々の刺激に対する内皮依存性の血管収縮反応が報告されている。血管の伸張や内圧の亢進といった機械的負荷による収縮、トロンビンによる収縮、血中酸素の減少による収縮、さらにはニューロペプチドY [Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 79, 5485 (1982); 同, 81, 4577 (1984)] によるノルアドレナリン収縮の増強などがその例である。アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー (Amer. J. Physiol.), 248, c550 (1985) 及びジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー (J. Cell. Physiol.), 132, 263 (1982) には、内皮細胞由来の冠血管収縮因子 (分子量はそれぞれ8500、3000) が記載されているが構造は不明である。また、ジャーナル・オブ・ファーマコロジー・アンド・エクスperimental・セラピューティクス (J. Ph

armac. Exp. Ther.), 236, 339 (1985) にも内皮細胞由来のペプチド様物質が記載されているが、これも構造は不明である。

【0003】 また、血管収縮作用を有するペプチドとしてバソプレッシン (Vasopressin) が知られておりそのアミノ酸配列も明らかにされているが、バソプレッシンが哺乳類または鳥類の血管内皮細胞を起源として単離されたという報告はない。更に、血管収縮作用を有するアンジオテンシン (Angiotensin) がウシ大動脈の内皮細胞から得られたという報告 [Circulation Research, 60, 422 (1987)] があるが、アンジオテンシンは分子量約1000のペプチドである。

【0004】 本発明者らの一部は、血管収縮作用を有するペプチドとして、先にブタ大動脈内皮細胞よりブタ・エンドセリンを単離することに成功し (特開平1-206997)、また本発明者らの一部は、ヒト・エンドセリンの単離、ブタ・エンドセリン及びヒト・エンドセリンのcDNAのクローニングにも成功している (特開平2-72877)。このブタ及びヒトのエンドセリンの成熟ポリペプチドのアミノ酸配列は同一で、これをエンドセリン-1と呼ぶ。また、本出願人は、ラット・エンドセリンの単離、cDNAのクローニングに関しても出願を行っており (特開平2-27983)、これをエンドセリン-3と呼ぶ。

【0005】 更に、本出願人は、マウス・エンドセリンの単離、cDNAのクローニングに関しても出願を行っており (特開平2-76583)、これをエンドセリンBと呼ぶ。更に、本出願人は、エンドセリン-1の一部をコードする合成DNAをプローブとして使用して、ヒトゲノムDNAライブラリーからエンドセリン-1とは異なるアミノ酸配列を有するエンドセリンをコードするDNAをクローニングした (特開平2-27983)。本発明者らはこのエンドセリンをエンドセリン-2と命名した。エンドセリン-2は主に腎臓と小腸で生産されており、平滑筋収縮作用などの作用を有することが明らかになっている。ここでエンドセリンとは、分子量2500±300でアミノ酸21個からなる血管収縮作用を有するペプチドの総称であり、そのアミノ酸のN末端から数えて第1番目、第3番目、第11番目、第15番目に位置する4個のシステインが2組のジスルフィド結合を形成している構造を有するものである。このジスルフィド結合の組合せとしては、1-15、3-11の組合せ、及び1-11、3-15の組合せがあるが、前者の組合せを有するものの方が生成比が高く、また活性も大きい。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 上記エンドセリンのうち、ヒト・エンドセリン-2の発現機序、特にヒト・エンドセリン-2 遺伝子のプロモーターについてはいまだ未知であり、プロモーター活性を有する最小の領域、プ

ロモーター活性の強さなどは解明されていない。本発明は、ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーター領域を含むDNAをクローニングし、プロモーター活性を有する最小の領域、プロモーター活性の強さなどを解明し、遺伝子組換え技術を用いた蛋白質またはペプチドの生産に役立てることを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、エンドセリン-1のゲノムDNAの一部をコードする合成DNAからなるDNAをプローブとして使用して、ヒトゲノムDNAライブラリーからヒト・エンドセリン-2遺伝子を単離した。そして、ヒト・エンドセリン-2遺伝子の様々な長さの5'末端領域のDNA断片をクローニングし、該断片をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼなどの構造遺伝子の5'上流に接続して、該DNA断片のプロモーター活性を確認した。そして、プロモーター活性を有するのに必要なDNA領域を決定し、この領域を含有するDNAを、遺伝子組換え技術を利用した蛋白質またはペプチドの大量生産に供することに成功した。

【0008】本発明のヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターは、配列番号1または図2に示される塩基配列を含有するものであるか或はその一部であり、公知のものとは異なる新規なものである。本発明におけるヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターを含有する発現ベクターは、例えば (i) ヒト細胞からゲノムDNAを分離し、このDNAをファージまたはプラスミドに組み込み、(ii) 得られた組み換えファージまたはプラスミドで宿主を形質転換し、(iii) 得られた形質転換体を培養後、形質転換体から適当な方法（例えばヒト・エンドセリン-2の一部をコードするDNAプローブとのハイブリタリゼーション）により、目的とするDNAを含有するファージあるいはプラスミドを単離し、(iv) その組み換えDNAから目的とするDNAを切り出し、(v) 該DNAまたはその一部を公知の動物細胞用の発現ベクター中のプロモーター領域と置換することにより製造することができる。

【0009】ヒト細胞からゲノムDNAを調製する方法としては、例えばマニアティス (T. Maniatis) らの方法 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), p. 280-285] などが挙げられる。このようにして得られたゲノムDNAをコリンズ (J. Collins) とホーン (B. Hohn) の方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 71, 2442 (1978)] に従いファージまたはプラスミドに組み込む。DNAを組み込むファージベクターとしては、例えば λ gt11 (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 80, 1194 (1983)) などが挙げられるが、その他のものであっても、宿主内で複製増殖されるものであれば用いることができる。ファージベクターにDNAを組み込む方法としては、例えばヒュン (Hyunh T. V.) らの方法 (DNA Cloni-

ng, A Practical Approach, 1, 49 (1985)) などが挙げられる。

【0010】DNAを組み込むプラスミドとしては、例えば大腸菌由来の pBR322 [Gene, 2, 95 (1977)]、pBR325 [Gene, 4, 121 (1978)]、pUC12 [Gene, 19, 259 (1982)]、pUC13 [Gene, 19, 259 (1982)]、枯草菌由来の pUB110 [Biochemical and Biophysical Research Communication, 112, 678 (1983)] などが挙げられるが、その他のものであっても、宿主内で複製増殖されるものであればいずれをも用いることができる。プラスミドにDNAを組み込む方法としては、メッソズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法 [Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986), p. 222-226] などが挙げられる。このようにして得られたファージベクターまたはプラスミドは、適当な宿主例えばエシェリキア (Escherichia) 属菌などに導入する。

【0011】上記エシェリキア属菌の例としては、エシェリキア・コリ (Escherichia coli) の菌株 K12 DH1 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 60, 160 (1968))、M103 [(Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981))、J A 221 [Journal of Molecular Biology, 120, 517 (1978)]、HB101 [Journal of Molecular Biology, 41, 459 (1969)]、C600 [Genetics, 39, 440 (1954)] などが挙げられる。ファージベクターで宿主を形質転換する方法としては、例えばインビトロパッケージング法 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), p. 256-268] などが挙げられる。

【0012】またプラスミドで宿主を形質転換する方法としては、例えばマニアティス (T. Maniatis) らのカルシウムクロライド法あるいはカルシウムクロライド/ルビジウムクロライド法 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), p. 249-255] などが挙げられる。また ヒト・エンドセリン-2遺伝子を含有するヒトゲノムDNAライブラリーは上記の方法などで得ることができるが、市販品として購入することも可能であり、例えばクローンテックラボラトリーズ社 (Clontech Laboratories Inc., 米国) から入手することができる。

【0013】ヒトゲノムDNAライブラリーからヒト・エンドセリン-2遺伝子をクローニングする方法としては、例えば、ファージベクター EMBL3 にヒトゲノムDNA断片を挿入したDNAライブラリーから、ヒト・エンドセリン-2のアミノ酸配列に基づいて化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして使用するブラークハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning Cold Spring Harbor Laboratory (1982), p. 320-328] によって単離する方法などが挙げられる。このようにしてクローニングされたヒト・エンドセリン-2遺伝子は必要があればプラスミド、例えば pBR322、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119 などにサブクローニングすることができる。

このようにして得られたDNAの塩基配列を、例えばマキサム・ギルバート(Maxam-Gilbert)法[Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 560(1977)]あるいはジデオキシ法[Nucleic Acids Research, 9, 309(1981)]によって決定し、既知のアミノ酸配列との比較からヒト・エンドセリン-2遺伝子の存在を確認する。以上のようにして、ヒト・エンドセリン-2の遺伝子が得られる。

【0014】後述の実施例2で得られたヒト・エンドセリン-2の遺伝子断片の制限酵素地図を図1に示す。またジデオキシ法で決定したDNAの塩基配列を図2ないし図4に示す。以上のようにしてクローニングされたヒト・エンドセリン-2遺伝子は目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化して使用することができる。クローニングされたDNAからプロモーターとして使用する領域を切り出し、発現に適したベクター中のプロモーターと置換し、更に該エンドセリン-2由来のプロモーターを含むDNA断片の下流に発現させたい構造遺伝子を連結して、発現ベクターを得ることができる。発現ベクターを作成する際の原料となるベクターとしてはレトロウイルス、ワクシニアウイルスなどの動物ウイルスなどが挙げられる。

【0015】動物ウイルス由来の発現ベクターにおいてSV-40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーターなどの代わりに、このヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターを使用することができる。このようにして構築されたヒト・エンドセリン-2遺伝子プロモーターを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。宿主としては、例えばエシェリキア属菌、動物細胞などが挙げられる。上記エシェリキア属菌としては、前記したものと同様のものが挙げられる。

【0016】動物細胞としては、例えばサル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO、マウスL細胞、ヒトFL細胞などが挙げられる。上記エシェリキア属菌の形質転換は、例えばプロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2110(1972)]やジーン[Gene, 17, 107(1982)]に記載の方法に従って行うことができる。動物細胞の形質転換は、例えばウイルス学[Virology, 52, 456(1973)]に記載の方法によって行うことができる。このようにして、ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

【0017】宿主がエシェリキア属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生成に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コンスチープ・リカー、ペプト

ン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母抽出物、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5.8が望ましい。

【0018】宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば5~20%の牛胎児血清を含むMEM培地[Science, 122, 501(1952)]、DMEM培地[Virology, 8, 396(1959)]、RPMI 1640培地[The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967)]、199培地[Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950)]などが挙げられる。pHは約6.8であるのが好ましい。培養は、通常約30~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。上記培養物から、ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターの下流に結合した構造遺伝子から発現した生成物を分離精製するには、例えば下記の方法により行うことができる。

【0019】発現された蛋白質またはペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチーム及び/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により蛋白質またはペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いうる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に蛋白質や成熟ペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

【0020】このようにして得られた培養上清あるいは抽出液中に含まれる蛋白質や成熟ペプチドは、公知の分離、精製法を適切に組み合わせて精製、分離することができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法限外ろ過法、ゲルろ過法、及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

【0021】このようにして得られたヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーター下流に結合した構造遺伝子がコードする蛋白質またはペプチドは、エンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。また生成物が生理活性を有する場合は、該活性を指標にして測定することができる。本明細書及び図面において、塩基な

どを略号で記載する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用記号に基づくものであり、その例を以下に挙げる。

【0022】DNA : デオキシリボ核酸

cDNA : 相補的デオキシリボ核酸

RNA : リボ核酸

mRNA : メッセンジャーリボ核酸

A : アデニン

T : チミン

G : グアニン

C : シトシン

なお、本発明のヒト・エンドセリン-2のプロモーターDNAにおいては、その塩基配列の一部が修飾（付加、除去、その他の塩基の置換など）されていてもよい。

【0023】

【実施例】以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、実施例3で得られた形質転換体エシェリキア・コリ (*Escherichia Coli*) DH10B/pHGET2は、平成4年11月26日から通商産業省微生物工業技術研究所 (FRI) に受託番号FERM-BP-4083として寄託されている。

【0024】実施例1 ヒト・エンドセリン-2の遺伝子の一部をコードするDNAプローブの作成

ヒト・エンドセリン-2のcDNAの5'末端側の配列である、配列番号4の塩基配列のDNAを化学合成し、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて常法に従って[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), p.122-127に記載] DNAの5'末端を32Pでラベルし、ヒト・ゲノムDNAライブラリーのスクリーニングに用いた。

【0025】実施例2 ヒト・エンドセリン-2遺伝子の単離とその塩基配列の決定

大腸菌Y1090にヒト白血球由来のゲノムDNAライブラリー (Clontech Laboratories Inc. 製) を感染させてプレーティングし、ファージブラクを出現させた。ベントンとデービス (benton W., Davis R.) の方法[Science, 196, 180 (1977)] に従って、ブラクを形成したファージDNAの一部をナイロン膜にレプリカし、32Pで標識した実施例1記載のDNAプローブとブラクハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは20%ホルムアミドの存在下42℃で行い、該膜は2×SSC、0.1% SDS中で40℃で洗浄した。プローブとハイブリダイズしたクローンを単離し、そのうちの1クローンからヒトゲノムDNAインサートを制限酵素HindIIIで切り出して、プラスミドpUC118にサブクローニングし、pHGEH1を得た。このプラスミドで大腸菌DH5αを形質転換し、形質転換体エシェリキア・コリ (*Escherichia Coli*) DH5α/pH

GEH1を得た。

【0026】このプラスミドに含有されるヒト・エンドセリン-2遺伝子の制限酵素地図を図1に示す。図中の□の区域は、ヒト・エンドセリン-2成熟体の一部のコード領域を示す。また、図1中、HはHindIII、PはPstI、BはBamHI、EはEcoRI、SmはSmaI、SaはSacI、SpはSphI、AcはAccI、HcはHincIIの切断部位を表す。また、この成熟体のコード領域とその周辺の塩基配列をサンガー (Sanger) の方法[Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463 (1977)] によって決定した。この塩基配列の一部を図2ないし図4 (配列番号1) 及び図5ないし図6に示す。図5ないし図6中、矢印の起点 (G) は転写開始点を、TATA boxで示した□の区域は真核細胞のプロモーターのコンセンサス配列であるTATAボックスを、負の数字は転写開始点からの距離を示す。

【0027】実施例3 ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーター領域の決定 (1)

(i) 実施例2においてプラスミドpHGEH1にサブクローニングされたヒト・エンドセリン-2の遺伝子の塩基配列 (ii) ヒト・エンドセリン-2をコードするcDNAの塩基配列 (特開平3-143127に記載) を比較して、プラスミドpHGEH1にサブクローニングしたヒト・エンドセリン-2の遺伝子の塩基配列中に、ヒト・エンドセリン-2の前駆体のエクソンが存在することを確認し、ヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流領域の3'末端側の境界 (エクソンIの5'末端に相当) を決定した。

【0028】図1に示すように、プラスミドpHGEH1にサブクローニングされたヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流には制限酵素HindIII、BamHI、EcoRI切断部位が存在する。pHGEH1をBamHIまたはEcoRIで部分分解したのち、大腸菌DNAポリメラーゼI処理により粘着末端 (staggered-end) を平滑末端 (blunt-end) に変換した[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), p.113-114 記載の方法による]。その後、形成した平滑末端にT4DNAリガーゼによりHindIIIリンカーを接続した。引き続きBssIで更にDNA切断を行った後 (BssI切断部位はヒト・エンドセリン-2のエクソンIのすぐ下流に存在する)、同様の方法でBssI切断部位を平滑末端化し、SalIリンカーを接続した。これらの操作により、5'末端にHindIII切断部位、3'末端にSalI切断部位を有し、異なる長さのヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流領域のDNAからなる3種類のDNA断片が得られた (それぞれ約3Kb、2Kb、1Kb)。

【0029】この3種のDNA断片を、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) をコードするDNAを含有するプラスミドpCAT-basic

(Promega社)のCAT遺伝子の直上流に位置するマルチクローニング部位内のHindIII切断部位とSalI切断部位との間に挿入し、3種のプラスミド(それぞれA、D、E)を得た(図7)。このプラスミドAは、形質転換体エシェリキア・コリ(Escherichia Coli)DH10B/pGET2(FERM BP-4083)に保持されている。図7中、HはHindIII、BはBamHI、EはEcoRI、SmはSmaI、SalはSalIの切断部位を表す。また、■で示される領域はヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流領域のDNAを、CATと記された□で示される領域はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードするDNAを、SV40と記された□で示される領域はSV40の複製開始点を含むDNAをそれぞれ表す。プラスミドAは約3Kbのインサートを、プラスミドDは約2Kbのインサートを、プラスミドEは約1Kbのインサートを有している。なおこのプラスミドAは、形質転換体エシェリキア・コリ(Escherichia Coli)DH10B/pHGET2(FERM BP-4083)に保持されている。

【0030】これらのプラスミドを精製した後[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory(1982), p88-96記載の方法による]、これらのプラスミドを、6cmシャーレ(Falcon社製)中で培養したヒト腎臓細胞ACHN(ATCC CRL1611)に磷酸カルシウム法[Methods in Molecular Biology, Elsevier(1986)p.286-289]により導入した。形質転換から48時間後に細胞を回収し、CATアッセイを行った[Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 83, 1598(1986)記載の方法による]。

【0031】図8に示すオートラジオグラムは、プラスミドA、プラスミドD、プラスミドEで形質転換した細胞はいずれもクロラムフェニコールを産生したことを示している。即ち、ヒト・エンドセリン-2遺伝子から単離された上記3種類のDNA断片はいずれもプロモーター活性を有することが判明した。なお、図5中、A、D、EはそれぞれプラスミドA、プラスミドD、プラスミドEで形質転換した細胞に対するCATアッセイのレーンを、BはネガティブコントロールとしてのプラスミドBで形質転換した細胞に対するCATアッセイのレーンを、CはポジティブコントロールとしてのプラスミドCで形質転換した細胞に対するCATアッセイのレーンを示す。

【0032】実施例4 ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーター領域の決定(2)

実施例3で得られたプロモーター活性を有するDNA断片のうち、プラスミドEにクローニングされた最も短い約1Kbの断片について、プロモーター活性を有する領域をさらに限定するために、該断片に含まれるより短いDNA断片がプロモーター活性を有するかどうかを検討した。実施例3で使用したクロラムフェニコールアセチ

ルトランスフェラーゼ(CAT)をコードするDNAに代えて、ホタル・ルシフェラーゼをコードするDNAをプロモーター活性を測定するDNA断片の下流に接続したプラスミドを構築した。構築方法は以下の通りである。

【0033】プラスミドEをHindIIIで切断し、切断されたDNAに対してエキソヌクレアーゼBamHIを用いて5'末端側からDNAの消化を行った[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory(1982), p.135-139 記載の方法による]。T4DNAポリメラーゼを用いてDNAの末端を平滑化した後、SacIリンカーを接続した。その後SalI(SalI切断部位は、ヒト・エンドセリン-2のエクソンIのすぐ下流に存在する)でDNAを切断し、T4DNAポリメラーゼを用いてDNAの末端を平滑化した後、BglIIのリンカーを接続した。これらの操作により、5'末端にSacI切断部位、3'末端にBglII切断部位を有し、プラスミドEにクローニングされた約1Kbのヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流領域のDNAの一部分からなる、様々な長さのDNA断片が得られた。

【0034】これらのDNA断片をルシフェラーゼ発現ベクターpGVのSacI-BglII部位に組み込み、pGV(-1173/+69LUC)、pGV(-658/+69LUC)、pGV(-355/+69LUC)を構築した(図9)。図9中、Lucはホタル・ルシフェラーゼをコードするDNAを示す。上記断片よりさらに大きく5'領域を欠損したDNA断片はPCR法を利用して合成した。DNAの5'末端にMluI認識配列、3'末端にBglII認識配列が存在するように合成を行った。合成した種々の長さのDNA断片をpGVのMluI-BglII部位に組み込み、pGV(-201/+69LUC)、pGV(-147/+69LUC)、pGV(-117/+69LUC)、pGV(-45/+69LUC)、pGV(-25/+69LUC)、pGV(+1/+69LUC)を構築した(図9)。

【0035】これらのプラスミドを精製した後[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory(1982), p88-96記載の方法による]、これらのプラスミドを、6cmシャーレ(Falcon社製)中で培養したヒト腎臓細胞ACHNに磷酸カルシウム法[Methods in Molecular Biology, Elsevier(1986)p.286-289]により導入した。その後、発現されたルシフェラーゼ活性を測定した[Mol. Cell Biol., 725(1987)記載の方法による]。その結果、ヒト・エンドセリン-2の遺伝子の転写開始部位から上流45塩基までの領域を有するDNA断片をルシフェラーゼ遺伝子の上流に結合したpGV(-45/+69LUC)もルシフェラーゼ遺伝子を発現することが判明した(図10)。即ち、ヒト・エンドセリン-2の遺伝子の転写開始部位から上流45塩基までの領域が、プロモ-

ター活性を有する最小単位であることが示された。

【0036】更に、ヒト・エンドセリン-2の遺伝子の転写開始部位から上流1173塩基までの領域を有するDNA断片をルシフェラーゼ遺伝子上流に結合したpGV(-1173/+69LUC)は、SV40のプロモーターの下流にルシフェラーゼ構造遺伝子を結合したプラスミドpGV-Pに比べて約4倍の発現量を示しており(図10)、該領域を有するDNA断片は、動物細胞用プロモーターとして非常に有用であることが判明した。なお、上記pGV(-1173/+69LUC)は、ヒト腎臓由来のACNH細胞のみならずサル腎臓由来のCOS7細胞中에서도発現が認められ、ヒト・エンドセリン-2の遺伝子のプロモーターは、動物細胞の腎臓由来の細胞で広く活性を有することが判明した。

【0037】

【発明の効果】本発明のヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターと製造したい蛋白質またはペプチドをコードする構造遺伝子とを結合した発現ベクターによって形質転換された細胞は、大量の目的とする蛋白質またはペプチドを産生するので、目的とする蛋白質またはペプチドの生産を効率よく行うことができる。また、ここに製造されるヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターを含有するベクターは、他の遺伝子のプロモーター(例えばヒト・エンドセリン-1遺伝子のプロモーター、ヒト・エンドセリン-3遺伝子のプロモーター)と

同じく、プロモーター活性を増減させる物質の検索にも利用することができる。更に、ここに製造されるヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターを含有するベクターを用いて、生体におけるヒト・エンドセリン-2の発現機構の解析や、ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターの制御物質の解明が可能となる。

【0038】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：3367

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル配列：No

起源：

生物名：Homo sapiens

細胞の種類：白血球

配列の特徴

特徴を表す記号：promoter

存在位置：3323..3367

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：TATA signal

存在位置：3338..3344

特徴を決定した方法：S

配列：

AAGCTTCTG	GTCCAGGGCC	TCGATTGCAA	TCCCAGGCAC	CTGCTGCAGC	CCAGCCCTGT	60
TGTGTCAAGC	ATCACTAGGA	GACTTAGTCT	TCACTCCCAT	GCAACCTCCA	TTCAGCTCAG	120
TGTCCACAGC	TGCTGGACAG	CTGCTTGACG	GGACCATAIT	TGCTCTTAGA	GCTGGGACTA	180
TAGAGGGAGC	TTTGGGCTGC	ACAGAGAGAC	AGCCTAACCT	CATCCCAATG	CCCCAGCCTT	240
CCTGCCAGTG	GGTCTCTTCC	TGACGGCCTT	TCTCCAAGGG	ACCCAGGATC	CTGGGCTCAG	300
TTTGGACCCC	TGGGAGAGCT	TCACGGGTCT	ACAGGAAAGG	GTGAGGCAGG	TTAGGAACCA	360
AGAGAACACA	CCCAGCCCCA	TCAGTGTCTT	GAGCCAGTTG	CTCCTCCTCT	TGCACCTCAG	420
TTATCTCATC	TACCAAATGG	GACTGGAGAC	GGGGAITTTCT	AGGGGAAGT	TTCTAGCCCCA	480
GTGTCTGACT	CAGAAATACA	CTCAACTGCT	CTCTTCTGCC	AGCCCTCCCT	CCCCATACAT	540
CCCTCTTTCT	TGATTGGGC	TGCTGCAAGC	ATAAGGGAAA	CAAATCGCTT	AGCGAGTAAA	600
GCAATTCTCT	TCAAATCTG	AGAGGGTGAC	CTTCGGTGGC	TCCCTGCCCT	TCCCCCTGCA	660
GCCTCAACAA	ACTCGGGCAG	GTGCCAGGGC	CAGAGAAGTG	GGGCCAGGGG	GTGCTGAAGC	720
CAGGCCACCT	AGAAAGGACA	GGGACAGTGA	GGCCAGGACA	GTATAGGTG	GCAGGGTCAT	780
GCAGTCCGAC	CAGCCACGAG	GGGAGAGGC	AACGGACAGA	GGCCAGGCT	AAGCGACCCA	840
GGGAGATGGG	GCTATTTTTA	ACTCAGCTTA	ATTTTCCCTA	CCTGGAAACT	AACTCTTGTC	900
AGTGGAGCAG	CGCTGTTCG	GGAATGGCTT	CATCCCCTAA	GATCTGTGCT	CGCTTAGGTT	960
CCTGGGCCAG	TCCTCTCCAT	TTACAGGAG	CCCTGCTTGT	TCAGCTCAGG	CAGAGGGCAG	1020
AGAAGGAGAG	AAACCGGAGC	CCGGCCGAGC	TCGCAGCTGG	CTGTGCTGAC	CCTGCGGGG	1080
TCGGGCAGCA	GGCCCTGCCT	TGTAGTCACC	CTTCTTTCAC	ACCCGGGAGG	GATCCTGTCT	1140
CTGGGTTTCA	TTAATGCTTC	TATTATGTTT	CCCCGGCTCG	GAGCCTCTGG	TTCCCTATTG	1200
TCTTGAGCAG	GCCTTTTGCA	TTTGTGTAAA	GATTAGACGC	TTTATAACCT	TCCCTCTTCT	1260
CCCTATGGTT	TCCCTCTTTT	ACTTTCTCAA	ATCTGAGTTC	TTTCTTTCTG	GCTACGCACT	1320
GCTTCCTCAT	TCTCCCTCTC	TCTCCCTGCC	TGTCTTTATC	TGCCTCCCTG	TTTGTTTTCC	1380
TCCCCACCAT	GACCCCTTCC	GTCTCCCGC	TGACCTGCTT	TTCTTCTTT	CTTCTCTTCA	1440

CGGTCCAGCG ATTTGAATTC TCTATCCACC CCCAAGCAGC CCCCAGCCCT GCTTAATTCC 1500
 GTATTCATAT TCTTGCAGAG GCTGATAGAA ATGACTGTGA GTATTGCTCA CCTCATTCCA 1560
 GAAATACTCT TCTAAATTCT TCGAGAGGCA CGACGTGGGA GGGCAGAGAG CACCTCACGG 1620
 GGAGTCCCTT GTGCTTTGCT TGATAGACCA AGCCACCTGC CCGCTGGGTG GCCTTGACCA 1680
 GGCCCTGCTC CTCTCTGAGC CTCGTGGGCA GTCCTGAGCT GACTCCCCTG TGATAATAGC 1740
 TGCCTCCTGG GGTGTGTGTC AGGAAGAGTC GATAGTGCTC CAAGCACGTA GTAGGTGCTC 1800
 AGGAAACATT TGTTTGTTTT TTTACAGGA GCCAGCTCAG TCTCCAGGAA GGAAGATCCT 1860
 GCTCTCACCC TCCATCAGTT CTGCCAGTTT CTCAGGATT TCACACATGC ACGCTTGCTC 1920
 TGGGCACACC CTAGGAAGAT GCAAACCTGC CTGTTCTGCG TGGTCACCTA CTGTCCCCCT 1980
 CATAAATGTC CAAGGACAAA GGAGCTGCTG AATACAGGAA CTGAGCATTG GGCATCCTGG 2040
 GTTCTGTAAG TGGAAAGCCA GGTGTGCATC TCTTGACCCC CCTGCCCTCA GGAAGCACTC 2100
 GCAAGGCCCC TACTGTGTGC AGGCTAGGTG TCAGGCCCTG CCTCCTCTGG GGCTCTGGAC 2160
 CTTGAGATTG CAGGGGAGAT AACTGCAATG GGATGACTCA GGCAGGCACG AGAGGCACAG 2220
 GCCCTGGGAA TTCCAAGAAA CGAGAGGGCC TTCTCTGTTG TGCCTGGAGA CAGGCTCCCT 2280
 GAGAAGACTC CAGCAGGAAG TGGACTCTCA GCCAGGGCAG GAACAGAGGG TGCCTGCCAG 2340
 TTCCCTGAGC TGCTCAGCAC AGCTGTGGTT CATCCCTGCT TTCCCTCCC CGGCAAGGCT 2400
 TCTGGGCCAG CAGAGGGGCA GGAGCAGAAT GCCAGTCCCC AGAGAAGTCC CCTGGCTTAC 2460
 TTCTTTTGCA GACAGTAGCC CCCGGTGGAA GCCAAGACAT CCTGTCATGG CCAGGACAGG 2520
 AGACTGTTC AAGGGCGCTT TGTGTGTGTG TCCTCAGGGA CATCTTTCTG GAAAGGGGTC 2580
 TGAAGCCACC TTCTTAGTCT CAAAGGAGCC TGAAGCCAA GCAGGTGAAG TACCTTCTTG 2640
 TTTTGGCCTT GTTTGCAAA CAGGAAACAG GCCCAGGAAG GATGCCCTTG GCCATGGCTG 2700
 CATAGCTGAA CAGCTTCTGG AAGGGACTAG AACTCCTGCC CCAGGCCCTG GGGTGACAGG 2760
 GCAGGGGTTG AGGGGGGCAT TTCCTGGGTG AGGTGGGGAT GAAGCAGTTC CAGGCTTGTC 2820
 AGAAGTCAGG CATGAGCTGT GTCCTTCACA GAGGGAGGCA GGCCAGAGA GGGCTCTGAC 2880
 TCGCCCAAGG CCACACAGCC TTGCGTGGGC CTTCACATC CCACACAACA GAGGGGCATC 2940
 CTCAGCCTGG TTGGCAGAGG GCAGGCAGGA TAGATGCCAG AGTCTTCTCC GAGGAGAGGG 3000
 GTTTTGCTCA TGGAACTCC TCCTCCACAC TCACAGCCCT GGGCGAGACC TGTGGAGCAG 3060
 CCGCCAACAG AGTGAGGGAG GGGGCTCGGG GCAGCTGGGG GTGACTTGAG GAAGTCCAGC 3120
 TGGACTGCCA GGGGCCCCTG GGGACTGCCA GGGAGCCTCA GGAAGTCCAG AGGTGCTCCA 3180
 GGCACAGAGG GAGGAATGGG CCTTCCATCT CCCTCCCCC TTCAGTGCAG AGGCTGGGTC 3240
 GGGCCAGGTG CCGGGGAGG AGGGGTGTC CCTGGTCCC AGCCCGCCGG TGCAGCGGGG 3300
 CAGGGCTGGA CCAGAAGGGG TGGGGCACCG TGCCTGGTAT AAGAGGCAGC CAGGGCACCG 3360
 AGGCAAT 3367

配列番号 : 2

配列の長さ : 1 1 7 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

ハイボセティカル配列 : No

起源 :

生物名 : Homo sapiens

細胞の種類 : 白血球

配列の特徴

特徴を表す記号 : promoter

存在位置 : 1129..1173

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : TATA signal

存在位置 : 1144..1150

特徴を決定した方法 : S

配列 :

GAGTCAGGCA GGCACGAGAG GCACAGGCCC TGGGAATTCC AAGAAACGAG AGGGCCTTTC 60
 CTGTTGTGCC TGGAGACAGG GTCCCTGAGA AGACTCCAGC AGGAAGTGA CTCTCAGCCA 120
 GGGCAGGAAC AGAGGGTGCC TGCCAGTTCC CTGAGCTGCT CAGCACAGCT GTGGTTCATC 180
 CCTGCTTTCC CCTCCCCGGC AAGGCTTCTG GGCACGAGA GGGCAGGAG CAGAATGCCA 240
 GTCCCCAGAG AAGTCCCCTG GCTTACTTCT TTTGCAGACA GTAGCCCCCG GTGGAAGCCA 300
 AGACATCCTG TCATGGCCAG GACAGGAGAC TGTTCAGGG GCGCTTTGTG TGTGTCTCCT 360
 CAGGGACATC TTTCTGAAA GGGGTCTGAA GCCACCTTCT TAGTCTCAA GGAGCCTGTA 420


```

AGCCAAGCAG GTGAAGTACC TTCTGTGTTT GGCCTTGTTT GCAAACAAGG AACAGGCC 480
AGGAAGGATG CCCTTGGCCA TGGCTGCATA GCTGAACAGC TTCTGGAAGG GACTAGAACT 540
CCTGCCCCAG GCCCTGGGCT GACAGGGCAG GGGTTGAGGG GGGCATTTCC TGGGTGAGGT 600
GGGGATGAAG CAGTTCAGG CTTGTCAGAA GTCAGGCATG AGCTGTGTCC TTCACAGAGG 660
GAGGCAGGCC CAGAGAGGGC TCTGACTCGC CCAAGGCCAC ACAGCCTTGC GTGGGCCTTT 720
CACATCCCAC ACAACAGAGG GGCATCCTCA GCCTGGTTGG CAGAGGGCAG GCAGGATAGA 780
TGGCAGAGTC TTCTCCGAGG AGAGGGGTTT TGCTCATGGA ACCTCCTCCT CCACACTCAC 840
AGCCCTGGGC GAGACCTGTG GAGCAGCCGC CAACAGAGTG AGGGAGGGGG CTCGGGGCAG 900
CTGGGGGTGA CTTGAGGAAG TCCAGCTGGA CTGCGAGGGG CCCCTGGGGA CTGCCAGGGA 960
GCCTCAGGAC TCCAGAGGT GCTCCAGGCA CAGAGGGAGG AATGGGCCTT CCATCTCCCT 1020
CCCCCTTCA CTGCAGAGGC TGGTCCGGC CAGGTGCCCG GCGAGGAGGC GGTGTCCCTG 1080
GCTCCAGGCC CGCCGGTGCA GCGGGCAGG GCTGGACCAG AAGGGGTGGG GCACCGTGCC 1140
TGGTATAAGA GGCAGCCAGG GCACCGAGGC AAT 1173

```

配列番号：3

配列の長さ：45

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル配列：No

起源：

生物名：Homo sapiens

細胞の種類：白血球

配列の特徴

特徴を表す記号：promoter

存在位置：1..45

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：TATA signal

存在位置：16..22

特徴を決定した方法：S

配列：

GGGCACCGTG CCTGGTATAA GAGGCAGCCA GGGCACCGAG GCAAT 45

配列番号：4

配列の長さ：45

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

配列：

AAAGAGTGTG TCTACTTCTG CCACCTGGAC ATCATCTGGG TCAAC 45

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒト・エンドセリン-2の前駆体の一部をコードするDNAを含むゲノムDNAの制限酵素地図である。

【図2】 ヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流域の塩基配列を示す図である。

【図3】 ヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流域の塩基配列を示す図である。

【図4】 ヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流域の塩基配列を示す図である。

【図5】 図2の塩基配列の一部で、TATAAボックスなどの転写シグナルの位置を示す図である。

【図6】 図2の塩基配列の一部で、TATAAボックスなどの転写シグナルの位置を示す図である。

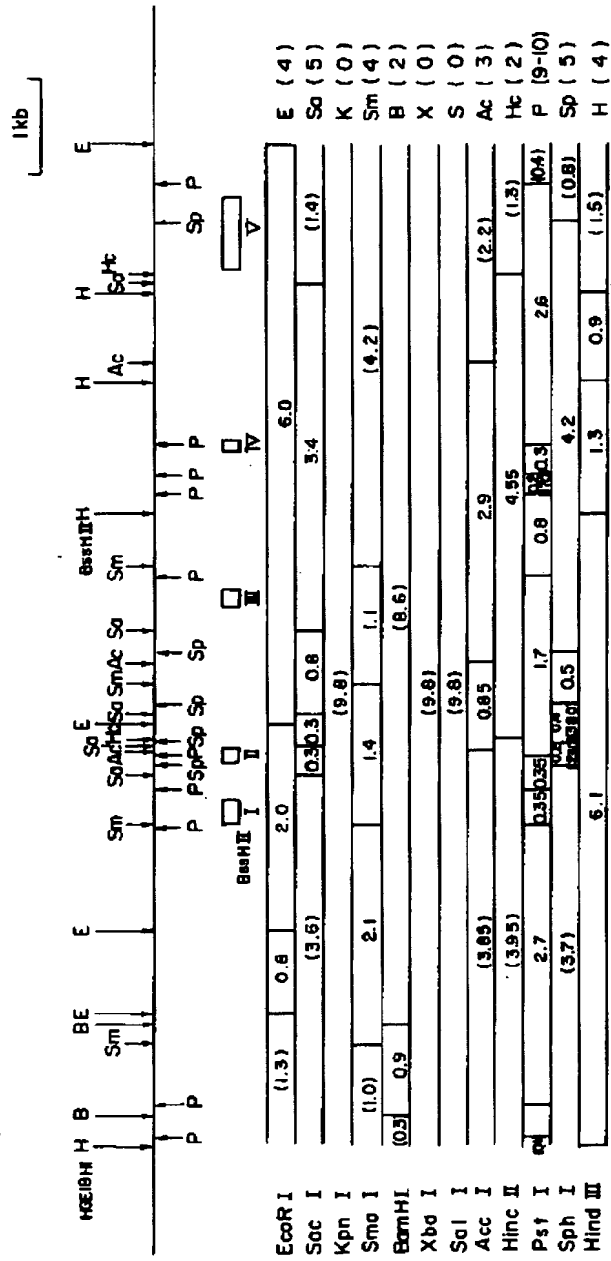
【図7】 ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターを含むDNA断片及び該DNA断片の下流に接続されたCAT遺伝子を含有するプラスミドである、プラスミドA、プラスミドD、プラスミドEの構成を示す図である。

【図8】 プラスミドA、プラスミドD、プラスミドEで形質転換されたヒト腎臓細胞のCATアッセイのオートラジオグラムを示す。

【図9】 発現ベクターに含有されるヒト・エンドセリン-2のプロモーターを含む種々のDNA断片とその下流に結合されたルシフェラーゼ遺伝子とを示す図である。

【図10】 図9に示されるDNA断片を含有するプラスミドでACNH細胞を形質転換した後、発現されるルシフェラーゼの活性を示す。

HGE 18 map



【図2】

AAGCTTCTGCTGAGGGGCTGGATTGCAATCCAGGACCTGCTGAGGCCAGGCTGT 60
 TGTGTACGACATCACTAGGAGACTTATGTTTCATCCATGCAACCTGCATTCACTCAG 120
 TGTCCACAGCTGCTGGACAGCTGCTGAGGAGGACATATTTGCTCTTAGAGCTGGGCTA 180
 TAGAGGGAGCTTTGGGGTGCACAGAGAGAGGCTTACCTCATCCAAATGCCCAGGCTT 240
 CCTGCGAGTGGGCTCTTCTGAGGAGGCTTCTTCCAGGGAGCCAGGATCTGCGGCTCAG 300
 TTTGGACCTTGGGAGGCTTCAAGGGGTGACAGGAAGGGTCAGGAGGTTAGGAACA 360
 AGAGAACACAGCCAGGCCATCAGTGTCTTGAAGCAGTGTGCTGCTCTGCACTCAG 420
 TTATCTCATCTACAAATGGAGTGAGAGGGGATTTCTAGGGGAGCTTCTAGGCCA 480
 GTGCTGAGCTCAGAAATCACTCACTGCTCTCTCTGCGCAGGCTGCTGCCATACAT 540
 CCTCTTCTTGGATTGCGCTGCTGCAAGCATAGGGGAACAAATGCTTAGGGAGTAA 600
 GCAATTCTCTCAAAATCTGAGAGGGGTGAGCTTGGGCTGCTGCTGCTGCCCTGCA 660
 GCTCAACAACTCTGGCAGGTGCCAGGGCCAGAGAGTGGGCGCAGGCGCTGCTGAGG 720
 CAGGGACCTCAGAAAGCAGGAGGACAGTGGGCGCAGGAGCAGTTATAGCTGCCAGGCTAT 780
 GCAGTCCGACGCCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 840
 GGGAGATGGGCTATTTTAACTAGCTTAAATTTTCCAGCTGCAAACTAACTTGTG 900
 AGTGGAGGAGGCTTGTGGGAGTGGCTTCACTGCCCTAGATGTGTGCTGCTTAGGT 960
 CCTGGGAGTGTCTGCTTCACTTCCAGAGGAGGCTGCTTGTGAGCTCAGGAGGAGGAG 1020
 AGAAGGAGAGAAACCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1080
 TGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1140
 CTGGGCTCATTTAATGCTTCTATTATGTTTCCGAGGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1200
 TCTTGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1260
 CCTATGCTTGTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT 1320
 GCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT 1380
 TCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1440
 GGTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1500
 GTATTCTATTTCTTGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1560
 GAAATCTCTTCTTAAATCTTCTTGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1620

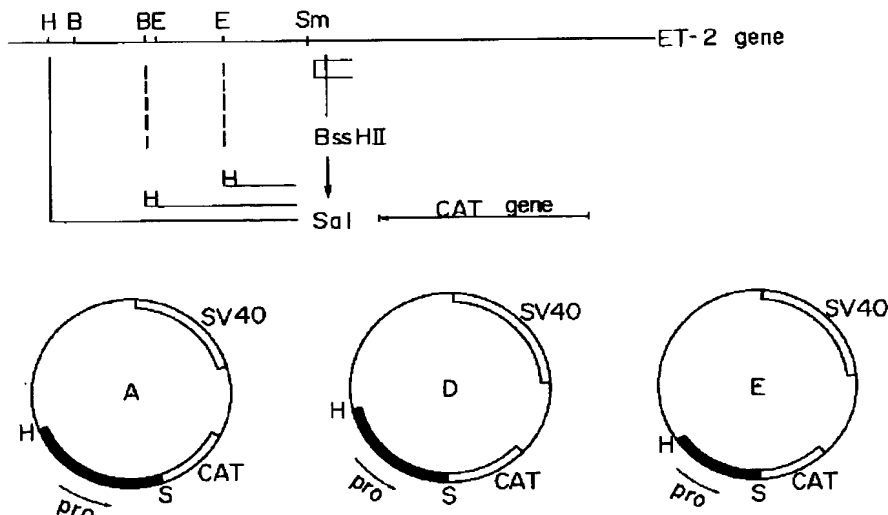
【図3】

GGAGTCCCTTGTCTTGTCTGATAGAACAAAGCCAGCTGCCCCCTGGGCTTGACCA 1680
 GGCCCTGCTCTCTCTGAGGCTGCTGGGAGTCTGAGCTGACTGCTGCTGATAATAGC 1740
 TGGCTCTGAGGCTTGTGTGAGGAGAGTGCATAGTCTGCAAGCAGTACTAGGCTGCTC 1800
 AGGAAACATTGT 1860
 GCTCTCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1920
 TGGGACACCTTAGGAGATGCAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1980
 CATAAATGTCAGGAGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2040
 GTCTCTAAGTGGAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2100
 GCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2160
 CTGAGATTCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2220
 GGGCTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2280
 GAGAG 2340
 TGGCTGAG 2400
 TCTGGGAG 2460
 TTTCTTTGAG 2520
 AGAG 2580
 TGAAGGAG 2640
 TTTTGGGCTTGTGTGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2700
 CATAGCTGAG 2760
 GCAAGGAG 2820
 AGAAGTCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2880
 TCCGAG 2940
 CTCAGGCTGAG 3000
 GTTTTCTGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3060
 CCGGAG 3120
 TGGAGTGGAG 3180
 GGCAGAG 3240

【図4】

GGGCCAGGTGCCGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3300
 CAGGCTGGAGCAGAG 3360
 AGGCAATGAGCTATCTGCTCAGCTTAAATAGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3420
 CAGTCCAGGCTGCGG 3436

【図7】



【図5】

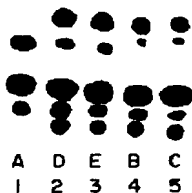
5' ACTCTTCTAAATTCITGAGAGGACGACGTGGGAGGBCAGAGAGCACTCAOGGGCACT
 OCTTGTGCTTTGCTTGATAGACCAAGCCACTGCCGCTGGGTGGCTTGACCAGGCC
 (ERE)
 TGCTCTCTGAGGCTGCTGGGCACTGCTGAGCTGACTGCCCTGTGATAATAGCTGCT
 (AP-1)
 OCTGGGTGTGCTGAGGAAGAGTGTAGTGTCTCCAGCACTAGTAGCTCTCAGAA
 ACATTGTGTTGTTTTTTCACAGGACGCTCAGTCTCCAGGAAGATCTGCTCT
 (CRE)
 CACCTCATCAGTCTGCTGCTGCTTCTCCAGGATTTACACATGCACTGCTGCTGCTG
 ACACCTAGGAAGATGCAACTTGGCTGTTCTGCTGCTCACTGCTGCTGCTGCTGCTG
 (OTF1)
 ATGTCCAAGGACAAAGGAGCTGCTGAAATACAGGAAGTCACTGCTGCTGCTGCTGCT
 (ERE)
 GTAAGTGAAGGACAGGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 (CREB)
 GGGCTACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 GATTGAGGGGAGATAAGTGAATGGGATGAGTCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 Jun/AP-1
 GGGAAATTCAGAAACGAGAGGGCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 GACTCCAGCAGGAAGTGGACTCTCAGCCAGGGCAGGAACAGAGGCTGCTGCTGCTGCTG
 (ERE)
 TGAGCTGCTCAGCAGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 GGCAGCAGAGGGGAGGAGCAGATGCCAGTCCGAGAGAGTCCCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 TTGACAGAGTGGGCTGGTGGAGGCAAGACATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 (TRE)

【図6】

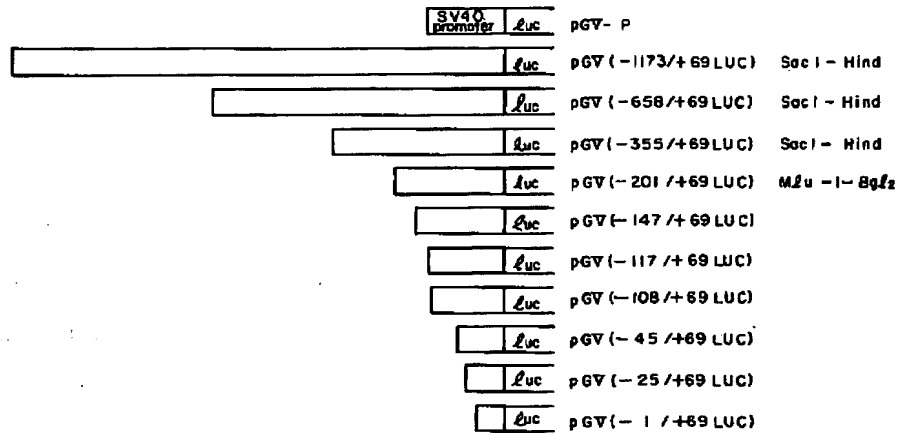
60 GTTCAAGGGGCGCTTTGTGTGTGTCTCAGGGACATCTTCTGCAAGGGGCTCTGAAG 1020
 (CREB)
 120 CCACCTTCTTACTCTCAAGGAGCTGTAGGCAAGCAGGTGAAGTACCTTCTGTTTGT 1080
 (ERE)
 180 GCTTGTGTTGCAAAACAGGAAACAGGCCAGGAAGGATGCCCTTGGCCATGGCTGCATAG 1140
 (OTF1)
 240 CTGAACAGCTTCTGGAAGGACTAGAACTCTGCCAGGCTGCGGTGACAGGGCAGG 1200
 300 GCTTCAAGGGGCGCTTTGTGTGTGTCTCAGGGACATCTTCTGCAAGGGGCTCTGAAG 1260
 (CREB)
 360 TCAGGCATGAGCTGTGTCTTCCAGAGGGAGGCGGAGGAGGGCTCTGCTGCTGCTGCTG 1320
 (AP-1)
 420 CAAGGCCACACAGCTTGGTGGGCTTTCATCCACACACAGAGGGGCTGCTGCTGCTGCTG 1380
 (ERE)
 480 CTTGCTTGGCAGAGGGCAGGAGGATAGTGGCAGAGTCTTCTCCAGGAGAGGGGTTTT 1440
 540 GCTCATGGAACCTCTCTCCACTCAGAGGCTGCGGAGAGCTGCTGAGCAGGGGCTG 1500
 600 AACAGAGTGAGGAGGGGCTGCGGAGCTGCGGAGCTGCGGAGCTGCGGAGCTGCGGAG 1560
 (CREB)
 660 TGCGAGGGGCGCTGCGGAGCTGCGGAGCTGCGGAGCTGCGGAGCTGCGGAGCTGCGGAG 1620
 720 AGAGGGAGGATGGGCTTCCATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 1680
 780 AGGTGCGGGGAGGAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 1740
 (MLTF/USP)
 840 CTGGACAGAGGGGTGGGCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 1800
 (ERE) TATAbox
 900 ATGAGCTATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 1860
 960 CAGCTGCGGCT' 1871

【図8】

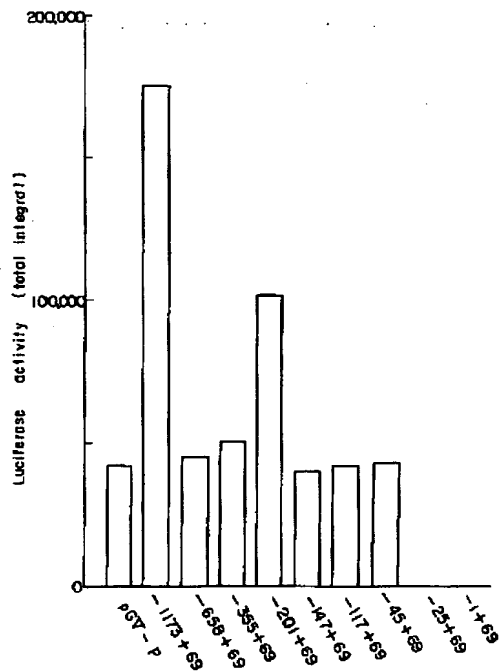
CAT - assay
 ACHN - ET 2
 culture 3 days



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵C12N 15/70
15/85

C12P 21/02

// A61K 37/02

C07K 13/00

(C12N 1/21

識別記号

片内整理番号

FI

技術表示箇所

C 8214-4B
ABT 8314-4C
8517-4H

C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 N 5/10
C 1 2 R 1:91)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:91)

Concise Explanation of Japanese Reference

Published Unexamined Patent Application No. Hei 06-165679

Title: DNA comprising a region having promoter activity of human endothelin-2

This invention relates to DNA containing DNA encoding a region having promoter activity of a vasopressor peptide, human endothelin-2; a vector containing said DNA; a transformant harboring said vector; and a method for having a structural gene expressed, wherein the gene encodes a protein or peptide and is linked downstream of the DNA having the promoter activity. Herein, by "promoter" is meant a DNA region to which RNA polymerase binds to signal initiation of RNA transcription.

The procedure for isolation of the promoter region is as follows: 1) human leukocyte genomic library was screened using labeled 5'-sequence of human endothelin-2 cDNA as probe; 2) a genomic clone was obtained, and physical map was prepared for this genomic region; 3) the promoter region, ca. 1 kb in length, was specified by CAT assay and sequencing; and 4) the promoter activity of this region was defined to more restricted region by luciferase assay using truncation mutants of this region.